

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-180835
(43)Date of publication of application : 23.07.1993

(51)Int.Cl. G01N 33/53

(21)Application number : 03-358006 (71)Applicant : S R L:KK
(22)Date of filing : 27.12.1991 (72)Inventor : KOYAMA MASATO

(54) MEASUREMENT OF LOOPS ANTI-COAGULANT

(57)Abstract:

PURPOSE: To balance coagulation promotion/coagulation suppress close to that in a blood vessel is reproduced in a test tube, and to judge positiveness of a loops anti-coagulant by 'contraction of time for coagulation' of the same propensity as thrombus under a condition quite close to in vivo by omitting coagulation promotion factors other than phosphatide and Ca ion, and by combining a protein C activation material for activating protein C's instead.

CONSTITUTION: Phosphatide, Ca ion and a protein C activation material (activated protein C itself or a protein C activator) are added to blood plasma to be tested, and coagulation reaction is generated in the blood plasma. Time for coagulating the blood plasma is measured, and the blood plasma whose coagulation time is shorter than that of normal blood plasma is judged positive for loops anti-coagulant.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The measuring method of the lupus anticoagulant characterized by adding phospholipid, calcium ion, and a protein C system activator to examined plasma, making said plasma produce a coagulation reaction, and measuring the coagulation time of this plasma.

[Claim 2] The measuring method of the lupus anticoagulant according to claim 1 said whose protein C system activator is activated protein C.

[Claim 3] The measuring method of the lupus anticoagulant according to claim 1 said whose protein C system activator is a protein C activator.

[Claim 4] The measuring method of the lupus anticoagulant according to claim 3 said whose protein C activator is snake venom.

[Claim 5] The measuring method of the lupus anticoagulant characterized by adding phospholipid and calcium ion to examined plasma at least, making said plasma produce a coagulation reaction, measuring the coagulation time of this plasma, and judging plasma with this coagulation time shorter than the coagulation time of normal plasma to be a positivity.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the measuring method of the antiphospholipid antibodies set to one of the causes, such as thrombosis and a habitual abortion, and lupus anticoagulant.

[0002]

[Description of the Prior Art] It is first found out by generalized Ellis Matteau Thijs's (SLE) patient, and after that, lupus anticoagulant (it is called "LAC" lupus anticoagulant and the following) is an anticoagulant (******) by which generating morbidly moreover a-posteriori in various kinds of symptoms (for example, thrombosis, a habitual abortion, etc.) in many cases is known, and the detection thru/or measurement is useful to a diagnosis and prevention of the above-mentioned thrombosis etc.

[0003] The body of the antiphospholipid-antibodies slack above LAC is carried out [that they are Immunoglobulin G (IgG) or Immunoglobulin M (IgM) in many cases and]. This LAC is a blood coagulation process, reacts immunologically with phospholipid and controls that biological activity. Thrombosis is rather accepted [in / LAC of this patient that has LAC showing a bleeding tendency, in spite of having the coagulation repressor-function to control the phospholipid which participates in a blood coagulation process is rare, and / such a patient] in high rate (for example, the "newest medicine" the 45th volume, No. 7, and 1882 pages (1990) reference).

[0004] as the LAC [former] measuring method using a coagulation time method — ** APTT (activated partial thromboplastin time) — law — ** TTI (thromboplastin inhibition test) — law — ** KCT (kaolin coagulation time) — law — ** DRVVT (dilution rales stypven time) — law — ** RBNP (*** phospholipid neutralization activated partial thromboplastin time) — law etc. is known.

[0005] Generally, in case a coagulation reaction is measured out of a living body (inch vitro), except for calcium ion which is the indispensable component of a coagulation reaction, calcium ion was added [from 1 *** examined plasma] at the time of measurement by chelating agents, such as a sodium citrate, and coagulation time is measured. In the above-mentioned conventional LAC measuring method, the coagulation time was measured for the activator (in an internal cause system, it sets in contact factor activators, such as an ERAJIN acid and a kaolin, and an external cause system, and they are coagulation system activators, such as a tissue thromboplastin) of phospholipid, calcium ion (it is usually CaCl₂ water solution) and an internal cause system, or an external cause system as an indispensable component in the specimen (examined plasma).

[0006] It more specifically sets for the above-mentioned conventional LAC measuring method. (In order to detect LAC efficiently) When LAC exists in a specimen using low-concentration phospholipid Existence of LAC in a specimen was proved to be coagulation time extension resulting from the activity deterioration of phospholipid based on association with this LAC and phospholipid using normalization of the coagulation time under high concentration phospholipid (concentration of extent with which inactivation of phospholipid by LAC in specimen can be compensated) existence etc.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, singularity [as opposed to / even if coagulation time extends by other factors other than (1) LAC in the above-mentioned conventional LAC measuring method, become a "LAC positivity", and / LAC] is unknown.; (in the conventional coagulation time measuring method, it is strongly influenced of the heparin which is the deficiency state of a coagulation factor, and anticoagulation drugs, and coagulation time extends in many cases)

(2) In order to judge the existence of abnormalities by extended" of "coagulation time, it takes time amount.;
(3) To circulating without blood coagulating being normal and sthenia (thrombosis etc.) of blood coagulation being unusual, by the conventional LAC measuring method, the condition (condition solidified in fixed time amount) of having accelerated blood coagulation artificially is normalized, and there is conflict of making into abnormalities the condition that the coagulation reaction was controlled (coagulation time extends), in the living body. That is, in

a conventional method, the functionality of the reaction (inch vitro) besides a living body and a reaction in the living body (inch vivo) is bad (that is, a different reaction from in the living body in in vitro may be measured). There was a fault to say.

[0008]

[Means for Solving the Problem] this invention persons realized wholeheartedly the condition that activating positively the blood coagulation inhibition reaction by the system in which protein C participates as a result of research bore a strong resemblance to a blood coagulation condition in the living body, and it found out enabling LAC measurement by the manifestation of thrombosis etc. in the living body and "compaction of coagulation time" of this inclination.

[0009] It is characterized by for the measuring method of the lupus anticoagulant of this invention adding phospholipid, calcium ion, and a protein C system activator to examined plasma (specimen), making said plasma produce a coagulation reaction in more detail based on the above-mentioned knowledge, and measuring the coagulation time of this plasma.

[0010] In the LAC measuring method of above-mentioned this invention, while activating a coagulation reaction by addition of phospholipid and calcium ion, it is the description to add positively the protein C system activator (for example, a protein C activator or activated protein C (itself)) which has the operation which a protein C (henceforth "PC") system is activated [operation] in a specimen, and produces the coagulation inhibition reaction in in vitro in a specimen. In in the living body, activated protein C (henceforth "APC") makes the activation coagulation V factor (Va) and activation coagulation factor VIII (VIIIa) which are a blood coagulation factor deactivate-ize under phospholipid and calcium ion existence, and has the function which controls a coagulation reaction. therefore, in the LAC measuring method of this invention, when LAC does not exist in a specimen The formation of coagulation labile by addition of the above-mentioned phospholipid and calcium ion, APC (namely, APC itself added to the system of reaction —) made to live together positively in a specimen And/or, the balance of coagulation reaction-coagulation inhibition reaction (a phospholipid layer or subsequent ones) near in the living body is realizable with combination with activation of the coagulation inhibition reaction by APC generated in the specimen based on addition of PC activator. Specimen slack examined plasma is presumed to be what (or for coagulation time to be extended extremely) is not solidified. On the other hand, when [this] LAC exists in a specimen, and LAC reacts with phospholipid and controls the activity, deactivation-ization of the coagulation factor (Va factor and VIIIa factor) by APC is controlled, and that by which the coagulation of plasma is promoted is presumed according to an operation of Va factor which was not deactivation-ized and a VIIIa factor as a result.

[0011] Furthermore, according to other modes of this invention, add phospholipid and calcium ion to examined plasma at least, said plasma is made to produce a coagulation reaction, the coagulation time of this plasma is measured, and the measuring method of lupus anticoagulant with which this coagulation time is characterized by judging plasma shorter than the coagulation time of normal plasma to be a positivity is offered.

[0012] Hereafter, the LAC measuring method of this invention is explained to a detail.

(Specimen) Plasma, i.e., the part which removed the material component of an erythrocyte and others from blood, is used. Immediately after extracting blood, after adding anticoagulants (for example, 3.8% sodium citrate), such as a sodium citrate, a suitable amount (the anticoagulant [as opposed to / For example, / blood 9] 1 comparatively), material components, such as an erythrocyte, can be removed with a conventional method (neglect or centrifugal actuation), and the examined plasma (or specimen) used for this invention can be obtained. Although anticoagulants other than a sodium citrate may be added if needed, since there is an inclination judged by the false negative (the conventional LAC measuring method false positive) in LAC measurement of this invention when heparin is added, as for heparin, not adding is desirable.

[0013] As for such examined plasma, it is desirable to warm beforehand before reaction initiation to temperature equal to reaction temperature (for example, 37 degrees C) from the point which raises the homogeneity of measurement data, and repeatability like various kinds of reagents which should be added to this. Although especially the die length of the time amount of such warming is not restricted, it is desirable to warm about (usually about 1 minute) 0.5 to 5 minutes in consideration of the balance of the quick nature of actuation, plasma and deterioration prevention of each reagent, and the homogeneity of temperature distribution.

[0014] (Phospholipid) Phospholipid means a lipid including Lynn. Lecithin (phosphatidylcholine) and other phosphatidic acid (phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, inositol phospholipid, cardiolipin, etc.), sphingomyelin, plasmalogen, etc. are contained in this phospholipid. Although **** phospholipid, bovine brain phospholipid, Homo sapiens placenta phospholipid, a soybean lecithin, etc. are used preferably, especially the thing for which the phospholipid which activates the both sides of a coagulation system and a protein C system is used is more specifically desirable. It is desirable to use for example, **** phospholipid (for example, **** phospholipid by the sigma company) from the point of the ease of receiving.

[0015] In this invention, it is desirable to use the phospholipid of 4 – 0.1U(unit)/ml extent and also about [2–0.5U/ml] concentration to 100micro of healthy person plasma I (about [for example, / 50micro] I). The amount of the phospholipid which makes the coagulation time by calcium ion addition under APC existence extend by 1.5 times of coagulation time (when phospholipid is not used) is said here 1U/ml about the amount of phospholipid.

[0016] More specifically in this invention, amount of phospholipid 1U (or concentration 1U/ml) is defined as follows.

density measurement approach <ingredient> healthy person mixing plasma [of phospholipid]: --- thing APC:refined material calcium chloride: which mixed ten or more healthy persons' 3.8% sodium-citrate ***** --- 25mM calcium chloride water solution (it prepares using distilled water)

A strange quantity (strange concentration) of phospholipid solution : (it prepares using HSA (human serum albumin) content barbital buffer solution 1%)

After adding 1U/ml APC50microl and 50micro of phospholipid solutions I of an unknown (strange concentration) to 100micro of <measuring method> healthy person mixing plasma I warmed beforehand and mixing, 100micro of 25 calcium chloride water solutions I of mM(s) warmed beforehand is added, and coagulation time (A) is measured. This coagulation time is equivalent to time amount until a fibrin is detected after the above-mentioned calcium chloride water-solution addition and in a specimen. As measuring equipment, an automatic coagulation measuring device "a core screener" (made in Boehringer Mannheim Yamanouchi (BMY)) is used preferably, for example. Except not using the above-mentioned phospholipid, the above-mentioned actuation is completely repeated similarly and coagulation time (B) is measured. In the above-mentioned measurement, phospholipid concentration from which the coagulation time of the system using A/B=1.5, i.e., phospholipid, will be 1.5 times the coagulation time of the system which does not use phospholipid is set to 1U/ml.

[0017] (Calcium ion) As a source of supply of calcium ion, a calcium chloride (CaCl₂) is usually used preferably. It sets to this invention and is CaCl₂ of concentration 10–100mM (preferably 20–50 mM, especially preferably 25mM extent) to 100micro of examined plasma I. As a solution, it is desirable to use about [10–200micro] I and about [further 25–100micro] I.

[0018] (Protein C system activator) In this invention, a protein C system activator means the matter (that is, Above APTT (activation thromboplastin time amount) is extensible) which can supply APC to this plasma by adding in healthy person plasma. In this invention, it is desirable to use PC activator which PC in APC itself or/and plasma (protein C) is activated [activator], and produces APC in plasma as this protein C system activator. It is the glycoprotein which has the blood coagulation accommodation [here / PC (protein C)] which can be combined with phospholipid. APC which is in the condition that PC was activated is a coenzyme (cofactor) about Protein S under phospholipid and calcium ion existence. It carries out and the above mentioned blood coagulation Va factor and the above mentioned VIIa factor are deactivation-ized specifically.

[0019] (Activated protein C) In this invention, the amount of APC which makes APTT using this APC extend the twice of APTT [usually / (when not using APC)] is said 1U/ml of APC (activated protein C).

[0020] In this invention, 1U/ml of APC is the following, and, more specifically, is made and defined.
density measurement approach <ingredient> healthy person mixing plasma [of activated protein C]: --- thing APTT measurement reagent: which mixed ten or more healthy persons' 3.8% sodium-citrate ***** --- an actin (dato company; Lot AS007)

calcium chloride: --- 25mM calcium chloride water-solution strange concentration APC: --- a refined material (it prepares using HSA content barbital buffer solution 1%)

<Measuring method> It mixes with APTT reagent 100microl beforehand warmed at 37 degrees C, healthy person mixing plasma 100microl, and APC50microl of strange concentration, 100microl is added for a calcium chloride water solution after a reaction for 3 minutes at 37 degrees C, and the coagulation time after this calcium chloride addition (A) is measured. Except replacing with Above APC and using the buffer solution of tales doses, the above-mentioned actuation is completely repeated similarly and coagulation time (B) is measured. In the above-mentioned measurement, APTT of the system using A/B=2, i.e., APC, sets to 1U/ml APC concentration which becomes twice APTT of the system which does not use APC. this invention --- setting --- 100micro of examined plasma I --- receiving --- APC --- about 0.5–10U --- further --- 2–5 --- using about U is desirable.

[0021] (Protein C activator) In this invention, the amount of PC activator which makes APTT using PC activator extend the twice of APTT [usually / (when not using PC activator)] is said 1U/ml of PC (protein C) activator. In this invention, it is good also considering the amount of the protein C activator which extends the coagulation time using phospholipid and a calcium chloride twice as 1U/ml.

[0022] density measurement approach <ingredient> healthy person mixing plasma [of PC activator]: --- thing APTT measurement reagent: which mixed ten or more healthy persons' 3.8% sodium-citrate ***** --- an actin (dato company; Lot AS007)

Calcium chloride: 100microl Add a calcium chloride solution and measure coagulation time (A), after mixing with

50micro of PC activator <measuring method> protein C activators I of healthy mixing plasma 100microl beforehand warmed at 37 degrees C, APTT reagent 100microl, and strange concentration of 25mM calcium chloride water-solution strange concentration and incubating for 3 minutes at 37 degrees C. Except not using the above-mentioned PC activator, the above-mentioned actuation is completely repeated similarly and coagulation time (B) is measured. In the above-mentioned measurement, PC activator concentration which the coagulation time of the system using A/B=2, i.e., PC activator, consists twice the coagulation time of the system which does not use PC activator of is set to 1U/ml. this invention -- setting -- 100micro of examined plasma I -- receiving -- PC activator -- about 0.5-9U -- further -- 2-6 -- using about U is desirable.

[0023] The complex of TRON BOMOJURIN (TM) and the thrombin which form a thrombin and complex as a PC activator in this invention, and activate PC, and TM, or snake venom (for example, pro tuck) is used preferably. It is desirable to use snake venom from the point which is generally easy to come to hand.

[0024] (The specimen for LAC measurement, and reagent) Although using as a water solution, respectively is also possible, as for three sorts of above-mentioned reagents, i.e., phospholipid, calcium ion, and PC system activator, it is desirable to use each as a buffer solution (for example, barbital buffer solution) from the point which raises the homogeneity of a reaction and repeatability. Furthermore, it is desirable to use the above-mentioned reagent from the point of a reagent and the stability of a reaction as a serum albumin (for example, human serum albumin, HSA) content buffer solution. In the LAC measuring method of this invention, although especially the sequence that adds the above-mentioned phospholipid, calcium ion, and PC system activator to examined plasma is not restricted, when the point that a coagulation reaction will be started in this plasma if phospholipid and calcium ion are added to examined plasma is taken into consideration, how to bend addition of PC system activator at the three above-mentioned person's last is desirable. Usually, it is desirable to make addition of calcium ion into the last of three sorts of reagents, or to add the three above-mentioned sorts of reagents in a specimen at coincidence.

[0025] As for the point of the facilities of actuation and the homogeneity of a reaction thru/or repeatability to examined plasma, phospholipid, calcium ion, and PC activator, in this invention, it is desirable to use it by the following concentration and/or amount used. In addition, the value at the time of setting examined plasma to 100microl shows the amount of reagents of (b), (c), and (d).

(a) Examined plasma : 25- 200microl (further 50-100microl)

(b) Phospholipid concentration : 0.1-4U/ml (further 0.5 - 2U/ml)

The amount used : (it converts, when phospholipid concentration 1.0U/ml is used)

10-200microl (further 50-100microl)

(c) calcium ion (CaCl₂ it converts into a solution)

Concentration: 10-100mM (further 20-50 mM)

The amount used : (25mM CaCl₂ it converts into a solution)

10-200microl (further 25-100microl)

(d) the case of PC system (activator i) APC itself -- concentration: -- 0.5-10U/ml (further 2 - 5U/ml)

The amount used : (it converts into a 2.0U/ml solution)

10-200microl (further 50-100microl)

(ii) -- the case of PC activator -- concentration: -- 0.5-9U/ml (further 2 - 6U/ml)

The amount used: 10-200microl (further 50-100microl)

[0026] (LAC measuring method) The existence of coagulation is preferably judged by whether the fibrin deposited for example, in examined plasma. the existence of this fibrin deposit -- business -- although it is also possible to judge by technique (for a fibrin deposit to be judged with the naked eye), it is desirable to measure the existence of the coagulation by fibrin deposit automatically from the point of the simplicity of actuation and the repeatability of a measurement result using an automatic coagulation measuring device (for example, "core screener" by Boehringer Mannheim Yamanouchi (BMY)). Although it is possible to perform detection of a fibrin using change of a "absorbance" generally, to others, change of transmittance, electric conductivity, electric resistance, or the mobility of a ball etc. may be used, and may be performed. The amount of a specimen, the reagent used, etc. may change with classes of device used for measurement.

[0027] The phospholipid of the specified quantity, PC system activator, and CaCl₂ after putting the initial complement (for example, 100microl) of examined plasma (specimen) which added the sodium citrate into the container for light absorption measurement (for example, reaction cuvette) in actual measurement, for example and carrying out grade warming for 1 minute at 37 degrees C beforehand if needed A solution is added to the above-mentioned (after warming at 37 degrees C if needed, respectively) plasma. It sets to this invention and is the above CaCl₂, for example. What is necessary is to make it react at 37 degrees C, and just to measure the time amount (coagulation time) to a fibrin deposit using a spectrophotometer etc., after starting timing measurement (starting for example, a second clock) and mixing with a mixed sample lightly at the same time it

adds solution addition.

[0028] In the LAC measuring method of this invention Phospholipid (differing from a conventional method), In order it is not indispensable to add blood coagulation promoting agent other than calcium ion, and to also activate a protein C system and to measure coagulation time in the near condition (condition that blood does not congeal simply), by in the living body, "The specimen to solidify" is judged in a certain fixed time amount to be a LAC positivity (abnormalities), and "the specimen which is not solidified" is judged to be LAC negative (normal) in this coagulation time.

[0029] Although coagulation time changes with the amount of the specimen to be used, and/or the concentration (or the amount used) of the reagent to be used, as for "fixed time amount" for the above-mentioned outlying-observation judging, from the point of the balance of the quick nature of measurement, and repeatability, it is desirable that they are about 100 ~ 3000 seconds and about further 300 ~ 1000 seconds.

[0030] As mentioned above, it sets for the conventional LAC measuring method. The specimen which is not solidified in predetermined time amount (cut-off value) is judged to be a LAC positivity (.). Namely, the existence of abnormalities is set for the LAC measuring method of this invention to having judged by "extension" of the coagulation time over a normal specimen. The description is to judge the specimen "is solidified" in time amount to predetermined in accordance with an inclination in the living body to be a LAC positivity (it judges by namely, "compaction of coagulation time [as opposed to a normal specimen for the existence of abnormalities]").

[0031] In this invention, time amount (cut-off value) predetermined [the point of balance with the repeatability (accuracy of measurement) of measurement and quick nature to / above-mentioned] has 1000 or less desirable seconds. As for this cut-off value, it is desirable to judge the specimen which processes statistically the measured value of the healthy person specimen (preferably 20 or more specimens) considered to be for example, LAC negative (for example, the value of **(average of distribution of healthy person measured value)2SD (standard deviation) corresponding to 95% of that distribution is calculated using a probability paper method), and shows coagulation time shorter than the acquired coagulation time (cut-off value) to be a LAC positivity. Hereafter, an example explains the LAC measuring method of this invention still more concretely.

[0032]

[Example]

Example 1 (approach using a protein C activator)

In the following measurement, coagulation time was measured using the automatic coagulation measuring device (trade name: core screener) by Boehringer Mannheim Yamanouchi (BMY). 100micro of examined plasma I which added the sodium citrate 3.8% (or 3.18%) was put into the reaction cuvette for the above-mentioned core screeners (content volume: about 1ml, product made from plastics), and it warmed for about 1 minute at 37 degrees C beforehand. the phospholipid (sigma company make --) beforehand warmed for about 1 minute at 37 degrees C to this plasma, respectively 1%HSA (human serum albumin) content barbital buffer solution 50microl of **** kephalin (concentration 0.25U/ml), HSA content barbital buffer solution 50microl (concentration 3U/ml) of a protein C activator (the thing of the pro tuck by the PENTA femme company, and a 3IU / vial is used) and three sorts of reagents of 100micro of 25mM calcium chloride solutions I were added. Measurement of the time amount according to a second clock to addition and coincidence of the above-mentioned calcium chloride solution is started, it mixed with the above-mentioned mixed sample lightly, and it was made to react at 37 degrees C. In the judgment of the existence of coagulation, the deposit (namely, coagulation) of a fibrin was judged by absorbance change by the above-mentioned core screener.

[0033] When coagulation time was measured with the above-mentioned LAC measuring method of this example about ten healthy specimens (plasma) by which both a coagulation factor and a protein C system are considered to be normal ranges based on measurement by the conventional method (TTI law and KCT law), these healthy person specimens are CaCl2. Even if 999 seconds had passed since addition, it did not solidify, but in this invention, it became clear that the system of reaction similar in the living body was realized. When it measured by the above-mentioned LAC measuring method of this example on the other hand about ten specimens judged by the thromboplastin inhibition test (TTI law) by the conventional method to be a LAC positivity, seven specimen is CaCl2 among the ten above-mentioned specimens. Solidifying in less than 999 seconds after addition, the coagulation time was 866.7 seconds from 339.9 seconds.

[0034] Example 2 (approach using activated protein C)

100micro of sodium-citrate ***** I was put into the cuvette, and it warmed for about 1 minute at 37 degrees C beforehand. 1%HSA content barbital buffer solution 50microl (concentration 1.0U/ml) of the phospholipid (sigma company make, *** phospholipid) beforehand warmed for about 1 minute at 37 degrees C, respectively, 1%HSA content barbital buffer solution 50microl (concentration 1U/ml) of activated protein C (refined material), and three sorts of reagents of 100micro of 25mM calcium chloride solutions I were added to this plasma. Measurement of the time amount according to a second clock to addition and coincidence of the above-mentioned calcium

chloride solution is started, it mixed with the above-mentioned mixed sample lightly, and it was made to react at 37 degrees C. In the judgment of the existence of coagulation, the deposit (namely, coagulation) of a fibrin was judged by absorbance change by the above-mentioned core screener.

[0035] When coagulation time was measured with the above-mentioned LAC measuring method of this example about ten healthy specimens (plasma) by which both a coagulation factor and a protein C system are considered to be normal ranges based on measurement by the conventional method (TTI law and KCT law), even if these healthy person specimens had passed for 1000 seconds since 25mM calcium chloride addition, they were not solidified. When it measured by the above-mentioned LAC measuring method of this example on the other hand about ten specimens judged by the thromboplastin inhibition test (TTI law) by the conventional method to be a LAC positivity, seven specimen is CaCl₂ among the ten above-mentioned specimens. Solidifying in less than 1000 seconds after addition, the coagulation time was 976 seconds from 227 seconds.

[0036]

[Effect of the Invention] As mentioned above, the balance of coagulation promotion / inhibitor of coagulation near in a blood vessel is realizable within a test tube (inch vitro) by combining the protein C system activator which does not make indispensable any accelerators of coagulation other than phospholipid and calcium ion according to this invention (a conventional LAC measuring method and a conventional difference), but replaces with "phospholipid and coagulation promoting agent other than calcium ion", and activates a protein C system. Therefore, according to this invention, the LAC measuring method which measures under conditions (namely, conditions which blood does not solidify easily) very near in the living body is offered.

[0037] According to the LAC measuring method of this invention, as moreover mentioned above by "extension of coagulation time" with the reverse inclination of thrombosis under remarkably different conditions (namely, conditions which blood tends [very] to solidify) from in the living body completely unlike the conventional LAC measuring method judged to be a LAC positivity, it is conditions very near in the living body, and moreover, a LAC positivity can be judged by "compaction of coagulation time" of the inclination of thrombosis, and this inclination.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-180835

(43) 公開日 平成5年(1993)7月23日

(51) Int. Cl.⁵

G01N 33/53

識別記号

W 8310-2J

F I

審査請求 未請求 請求項の数5 (全6頁)

(21) 出願番号	特願平3-358006	(71) 出願人	390037006 株式会社エスアールエル 東京都新宿区西新宿2丁目4番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)12月27日	(72) 発明者	小山 正人 東京都八王子市小宮町51 エスアールエル 八王子ラボラトリー内

(54) 【発明の名称】ループスアンチコアグラントの測定方法

(57) 【要約】

【構成】 被検血漿にリン脂質、カルシウムイオンおよびプロテインC系活性化物質（活性化プロテインC自体又はプロテインC活性化剤）を加えて前記血漿に凝固反応を生じさせ、該血漿の凝固時間を測定して、該凝固時間が正常血漿の凝固時間より短い血漿をループスアンチコアグラント陽性と判定する。

【効果】 リン脂質、Caイオン以外の凝固促進因子を必須とせず、これに代えてプロテインC系を活性化するプロテインC系活性化物質を組合せることにより、血管内に近い凝固促進／凝固抑制のバランスを試験管内(*in vitro*)で実現でき、生体内に極めて近い条件（すなわち、血液が容易には凝固しない条件）下で、血栓症と同傾向の「凝固時間の短縮」でループスアンチコアグラント陽性を判定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検血漿にリン脂質、カルシウムイオンおよびプロテインC系活性化物質を加えて前記血漿に凝固反応を生じさせ、該血漿の凝固時間を測定することを特徴とするループスアンチコアグラントの測定方法。

【請求項2】 前記プロテインC系活性化物質が活性化プロテインCである請求項1記載のループスアンチコアグラントの測定方法。

【請求項3】 前記プロテインC系活性化物質がプロテインC活性化剤である請求項1記載のループスアンチコアグラントの測定方法。

【請求項4】 前記プロテインC活性化剤が蛇毒である請求項3記載のループスアンチコアグラントの測定方法。

【請求項5】 被検血漿に少なくともリン脂質およびカルシウムイオンを加えて前記血漿に凝固反応を生じさせ、該血漿の凝固時間を測定して、該凝固時間が正常血漿の凝固時間より短い血漿を陽性と判定することを特徴とするループスアンチコアグラントの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、血栓症・習慣性流産等の原因の一つとされる抗リン脂質抗体、ループスアンチコアグラントの測定方法に関する。

【0002】

【從来の技術】 ループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant, 以下「LAC」という) は、全身性エリスマトーデス (SLE) の患者に最初に見出され、その後、各種の病態 (例えば、血栓症・習慣性流産等) において後天的に、しかも多くの場合病的につ発生することが知られているアンチコアグラン (抗凝血素) であり、その検出ないし測定は、上記血栓症等の診断・予防に有用である。

【0003】 抗リン脂質抗体たる上記LACの本体は、イムノグロブリンG (IgG) 又はイムノグロブリンM (IgM) であることが多いとされている。このLACは、血液凝固過程で、リン脂質と免疫学的に反応し、その生物学的活性を抑制する。LACは、血液凝固過程に関与するリン脂質を抑制するという凝固抑制因子的な機能を有するにもかかわらず、該LACを有する患者が出血傾向を示すことは稀であり、このような患者においては、むしろ血栓症が高率に認められる (例えば、「最新医学」第45巻、第7号、1882頁 (1990年) を参照)。

【0004】 従来より、凝固時間法を用いたLAC測定方法としては、

① APTT (活性化部分トロンボプラスチン時間) 法

② TTI (トロンボプラスチン抑制試験) 法

③ KCT (カオリン凝固時間) 法

④ DRVVT (希釈ラッセル蛇毒時間) 法

⑤ RBNP (兔脳リン脂質中和活性化部分トロンボプラスチン時間) 法
等が知られている。

【0005】 一般に、凝固反応を生体外 (in vitro) で測定する際には、一たん被検血漿から凝固反応の必須成分であるCaイオンをクエン酸ナトリウム等のキレート剤で除き、測定時にCaイオンを加えて凝固時間を測定している。上記した従来のLAC測定法においては、検体 (被検血漿) に、リン脂質、Caイオン (通常はCaCl₂水溶液) および内因系又は外因系の活性化剤 (内因系においては、エラジン酸、カオリン等の接触因子活性化剤、外因系においては組織トロンボプラスチン等の凝固系活性化剤) を必須成分として加えて、その凝固時間を測定していた。

【0006】 より具体的には、上記従来のLAC測定法においては、(LACを効率よく検出するため) 低濃度のリン脂質を用い、検体中にLACが存在する場合には、該LACとリン脂質との結合に基づくリン脂質の活性低下に起因する凝固時間延長と、高濃度リン脂質 (検体中のLACによるリン脂質の不活性化を補い得る程度の濃度) 存在下における凝固時間の正常化等を用いて、検体中のLACの存在を証明していた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上記従来のLAC測定法においては

(1) LAC以外の他の因子により凝固時間が延長しても「LAC陽性」となってしまい、LACに対する特異性が不明である (従来の凝固時間測定法においては、凝固因子の欠乏状態、抗凝固薬剤であるヘパリンの影響を強く受け、凝固時間が延長するケースが多い) ;

(2) 「凝固時間の延長」で異常の有無を判断するため、時間がかかる;

(3) 生体内では血液が凝固せずに循環していることが正常であり、血液凝固の亢進 (血栓症等) が異常であるのに対し、従来のLAC測定法では、血液凝固を人為的に亢進させた状態 (一定時間内に凝固する状態) を正常とし、凝固反応が抑制 (凝固時間が延長) された状態を異常とするという矛盾がある。すなわち、従来法においては生体外 (in vitro) の反応と、生体内 (in vivo) の反応の相関性が悪い (すなわち、in vitroにおいて生体内と異なる反応を測定している可能性がある) ; という欠点があった。

【0008】

【問題点を解決するための手段】 本発明者らは鋭意研究の結果、プロテインCが関与する系による血液凝固抑制反応を積極的に活性化させることができ、生体内の血液凝固状態に極めてよく似た状態を実現させ、生体内における血栓症等の発現と同傾向の「凝固時間の短縮」によるLAC測定を可能とすることを見出した。

50 【0009】 本発明のループスアンチコアグラントの測

定方法は上記知見に基くものであり、より詳しくは、被検血漿（検体）にリン脂質、カルシウムイオンおよびプロテインC系活性化物質を加えて前記血漿に凝固反応を生じさせ、該血漿の凝固時間を測定することを特徴とするものである。

【0010】上記した本発明のL A C測定法においては、リン脂質およびCaイオンの添加により凝固反応を活性化するとともに、検体中においてプロテインC（以下「PC」という）系を活性化してin vitroにおける凝固抑制反応を生じさせる作用を有するプロテインC系活性化物質（例えば、プロテインC活性化剤又は活性化プロテインC自体）を積極的に検体中に添加することが特徴である。生体内において、活性化プロテインC（以下「APC」という）は、リン脂質とCaイオン存在下、血液凝固因子であるところの活性化凝固第V因子（Va）および活性化凝固第VIII因子（VIIIa）を失活化させ、凝固反応を抑制する機能を有する。したがって、本発明のL A C測定法において、検体中にL A Cが存在しない場合には、上記したリン脂質およびCaイオンの添加による凝固反応活性化と、検体中に積極的に共存させたAPC（すなわち、反応系に添加したAPC自体、および／又はPC活性化物質の添加に基づき検体中に生成したAPC）による凝固抑制反応の活性化との組合せにより生体内に近い（リン脂質層以降の）凝固反応-凝固抑制反応のバランスが実現でき、検体たる被検血漿は凝固しない（もしくは凝固時間が極端に延長される）ものと推定される。他方、検体中にL A Cが存在する場合には、該L A Cがリン脂質と反応してその活性を抑制することにより、APCによる凝固因子（Va因子およびVIIa因子）の失活化が抑制され、結果として、失活化されなかったVa因子およびVIIIa因子の作用により、血漿の凝固が促進されるものと推定される。

【0011】更に、本発明の他の態様によれば、被検血漿に少なくともリン脂質およびカルシウムイオンを加えて前記血漿に凝固反応を生じさせ、該血漿の凝固時間を測定して、該凝固時間が正常血漿の凝固時間より短い血漿を陽性と判定することを特徴とするループスアンチコアグラントの測定方法が提供される。

【0012】以下、本発明のL A C測定法を詳細に説明する。

（検体）血漿、すなわち、血液から赤血球その他の有形成分を取り除いた部分を用いる。血液を採取した後、直ちにクエン酸ナトリウム等の抗凝固剤（例えば3.8%クエン酸ナトリウム）を適量（例えば、血液9に対し抗凝固剤1の割合）加えた後、常法（放置又は遠心操作）によって赤血球等の有形成分を取り除いて、本発明に使用する被検血漿（ないし検体）を得ることができる。必要に応じ、クエン酸ナトリウム以外の抗凝固剤を加えてもよいが、ヘパリンを添加すると、本発明のL A C測定では陰性（従来のL A C測定法では陽性）に

判定される傾向があるので、ヘパリンは加えないことが望ましい。

【0013】このような被検血漿は、これに加えるべき各種の試薬と同様に、反応開始前に、あらかじめ反応温度（例えば37°C）に等しい温度に加温しておくことが、測定データの均一性および再現性を高める点から好ましい。このような加温の時間の長さは特に制限されないが、操作の迅速性、血漿および各試薬の変質防止と、温度分布の均一性とのバランスを考慮して0.5～5分程度（通常は1分程度）加温することが好ましい。

【0014】（リン脂質）リン脂質とはリンを含む脂質をいう。このリン脂質には、レシチン（ホスファチジルコリン）およびその他のホスファチジン酸類（ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、イノシトールリン脂質、カルジョライピン等）、スフィンゴミエリン、およびプラスマロゲン等が含まれる。より具体的には、例えば、兎脳リン脂質、牛脳リン脂質、ヒト胎盤リン脂質、大豆レシチンなどが好ましく用いられるが、凝固系およびプロテインC系の双方を活性化するリン脂質を用いることが特に好ましい。入手し易さの点からは、例えば、兎脳リン脂質（例えば、シグマ社製兎脳リン脂質）を用いることが好ましい。

【0015】本発明においては、健常者血漿100μlに対して、4～0.1U（ユニット）/ml程度、更には2～0.5U/ml程度の濃度のリン脂質を（例えば50μl程度）用いることが好ましい。ここに、リン脂質の量について1U/mlとは、APC存在下のCaイオン添加による凝固時間を（リン脂質を用いない場合の）凝固時間の1.5倍に延長させるリン脂質の量をいう。

【0016】より具体的には、本発明においては、リン脂質量1U（ないし濃度1U/ml）は、以下のように定義される。

リン脂質の濃度測定方法

<材料>

健常者混合血漿：健常者10名以上の3.8%クエン酸ナトリウム加血漿を混合したもの

APC：精製品

塩化カルシウム：2.5mM塩化カルシウム水溶液（蒸留水を用いて調製）

未知の量（未知濃度）のリン脂質溶液：(1% HSA (ヒト血清アルブミン) 含有バルビタール緩衝溶液を用いて調製)

<測定方法> 予め加温した健常者混合血漿100μlに、1U/mlのAPC 50μl、および未知量（未知濃度）のリン脂質溶液50μlを加え混合した後、予め加温した2.5mMの塩化カルシウム水溶液100μlを加え、凝固時間（A）を測定する。この凝固時間は、上記塩化カルシウム水溶液添加後、被検試料中にフィブリンが検出されるまでの時間に相当する。測定機器として

は、例えば自動凝固測定装置「コアスクリーナー」(ベーリンガー・マンハイム山之内(BMY)社製)が好ましく用いられる。上記リン脂質を用いない以外は、まったく同様にして上記操作をくり返し、凝固時間(B)を測定する。上記測定において、 $A/B = 1.5$ 、すなわちリン脂質を用いた系の凝固時間がリン脂質を用いない系の凝固時間の1.5倍となるリン脂質濃度を1U/m1とする。

【0017】(カルシウムイオン)カルシウムイオンの供給源としては、通常、塩化カルシウム(CaCl₂)が好ましく用いられる。本発明においては、被検血漿100μlに対して、濃度1.0~1.00mM(より好ましくは2.0~5.0mM、特に好ましくは2.5mM程度)のCaCl₂溶液として、1.0~2.00μl程度、更には2.5~1.00μl程度を用いることが好ましい。

【0018】(プロテインC系活性化物質)本発明において、プロテインC系活性化物質とは、健常者血漿中に添加することにより、該血漿にAPCを供給できる(すなわち上記APTT(活性化トロンボプラスチック時間)を延長できる)物質をいう。本発明において、このプロテインC系活性化物質としては、APC自体、又は/および血漿中のPC(プロテインC)を活性化して血漿中にAPCを生じさせるPC活性化剤を用いることが好ましい。ここに、PC(プロテインC)とは、リン脂質と結合することが可能な血液凝固調節作用を有する糖タンパク質である。PCが活性化された状態であるAPCは、リン脂質およびCaイオン存在下に、プロテインSを補酵素(cofactor)として前記した血液凝固V.a因子およびVIIa因子を特異的に失活化する。

【0019】(活性化プロテインC)本発明においてAPC(活性化プロテインC)の1U/m1とは、該APCを用いたAPTTを、通常(APCを用いない場合)のAPTTの2倍に延長させるAPCの量をいう。

【0020】より具体的には、本発明においてAPCの1U/m1は以下のようにして定義される。

活性化プロテインCの濃度測定方法

<材料>

健常者混合血漿：健常者10名以上の3.8%クエン酸ナトリウム加血漿を混合したもの

APTT測定試薬：アクチン(ディド社；Lot AS 007)

塩化カルシウム：2.5mM塩化カルシウム水溶液

未知濃度APC：精製品(1%HSA含有バルビタール緩衝液を用いて調製)

<測定方法>予め37℃に暖めたAPTT試薬100μl、健常者混合血漿100μl、未知濃度のAPC50μlを混和し、37℃で3分間反応の後、塩化カルシウム水溶液を100μlを加え、該塩化カルシウム添加後の凝固時間(A)を測定する。上記APCに代えて同量の緩衝液を用いる以外は、まったく同様にして上記操作

をくり返し、凝固時間(B)を測定する。上記測定において、 $A/B = 2$ 、すなわちAPCを用いた系のAPTTがAPCを用いない系のAPTTの2倍となるAPC濃度を1U/m1とする。本発明においては、被検血漿100μlに対して、APCを0.5~1.0U程度、更には2~5U程度用いることが好ましい。

【0021】(プロテインC活性化剤)本発明においては、PC(プロテインC)活性化剤の1U/m1とは、PC活性化剤を用いたAPTTを、通常(PC活性化剤を用いない場合)のAPTTの2倍に延長させるPC活性化剤の量をいう。本発明においては、リン脂質と塩化カルシウムを用いた凝固時間を2倍に延長するプロテインC活性化剤の量を1U/m1としてもよい。

【0022】PC活性化剤の濃度測定方法

<材料>

健常者混合血漿：健常者10名以上の3.8%クエン酸ナトリウム加血漿を混合したもの

APTT測定試薬：アクチン(ディド社；Lot AS 007)

塩化カルシウム：2.5mM塩化カルシウム水溶液
未知濃度のPC活性化剤

<測定方法>予め37℃に暖めた健常混合血漿100μl、APTT試薬100μl、未知濃度のプロテインC活性化剤50μlを混和し、37℃で3分間インキュベートした後、塩化カルシウム液を100μl加え凝固時間(A)を測定する。上記PC活性化剤を用いない以外は、まったく同様にして上記操作をくり返し、凝固時間(B)を測定する。上記測定において、 $A/B = 2$ 、すなわちPC活性化剤を用いた系の凝固時間が、PC活性化剤を用いない系の凝固時間の2倍となるPC活性化剤濃度を1U/m1とする。本発明においては、被検血漿100μlに対して、PC活性化剤を0.5~9U程度、更には2~6U程度用いることが好ましい。

【0023】本発明においてはPC活性化剤として、トロンビンと複合体を形成しPCを活性化するトロンボモジュリン(TM)、トロンビンとTMの複合体、または蛇毒(例えば、プロタック)等が好ましく用いられる。一般的に入手し易い点からは、蛇毒を用いることが好ましい。

【0024】(LAC測定用検体および試薬)上記した3種の試薬、すなわちリン脂質、CaイオンおよびPC系活性化物質は、それぞれ水溶液として用いることも可能であるが、反応の均一性、再現性を向上させる点からは、それぞれを緩衝液(例えば、バルビタール緩衝液)として用いることが好ましい。更には試薬および反応の安定性の点からは、上記試薬を血清アルブミン(例えばヒト血清アルブミン、HSA)含有緩衝液として用いることが好ましい。本発明のLAC測定方法においては、上記リン脂質、CaイオンおよびPC系活性化物質を被検血漿に添加する順序は特に制限されないが、リン

脂質およびCaイオンを被検血漿に添加すると、該血漿中で凝固反応が開始される点を考慮すると、PC系活性化物質の添加を上記三者の最後にしない方が好ましい。通常は、Caイオンの添加を三種の試薬の最後とするか、又は検体に上記三種の試薬を同時に添加することが好ましい。

【0025】本発明においては、操作の便宜および反応の均一性ないし再現性の点から、被検血漿、リン脂質、Caイオン、およびPC活性化物質は、以下の濃度および／又は使用量で使用することが好ましい。なお、

(b)、(c)および(d)の試薬量は、被検血漿を100μlとした場合の値で示す。

(a) 被検血漿：25～200μl（更には50～100μl）

(b) リン脂質

濃度：0.1～4U/m1（更には0.5～2U/m1）

使用量：（リン脂質濃度1.0U/m1を使用した場合に換算）

10 10～200μl（更には50～100μl）

(c) Caイオン（CaCl₂溶液に換算）

濃度：1.0～10.0mM（更には2.0～5.0mM）

使用量：(2.5mM CaCl₂溶液に換算)

10 10～200μl（更には2.5～1.0μl）

(d) PC系活性化物質

(i) APC自体の場合

濃度：0.5～1.0U/m1（更には2～5U/m1）

使用量：(2.0U/m1の溶液に換算)

10 10～200μl（更には50～100μl）

(ii) PC活性化剤の場合

濃度：0.5～9U/m1（更には2～6U/m1）

使用量：10～200μl（更には50～100μl）

【0026】（LAC測定方法）凝固の有無は、例えば、被検血漿中にフィブリンが析出したか否かで好ましく判定される。このフィブリン析出の有無は、用手法（肉眼でフィブリン析出を判定）で判定することも可能であるが、操作の簡便さおよび測定結果の再現性の点からは、自動凝固測定装置（例えば、ベーリングガーマンハイム山之内（BMY）社製の「コアスクリーナー」）を用い、フィブリン析出による凝固の有無を自動的に測定することが好ましい。フィブリンの検出は、一般に「吸光度」の変化を用いて行なうことが可能であるが、他に、透過度、電導度、電気抵抗、ないしポールの移動度の変化等を用いて行ってよい。測定に使用する機器の種類により、検体、試薬等の使用量は異なる場合がある。

【0027】実際の測定においては、例えば、クエン酸ナトリウムを加えた被検血漿（検体）の必要量（例えば100μl）を、光吸収測定用の容器（例えば反応キュベット）に入れ、必要に応じて予め37℃で1分間程度加温した後、所定量のリン脂質、PC系活性化物質およ

びCaCl₂溶液を、（必要に応じてそれぞれ37℃に加温した後）上記血漿に添加する。本発明においては、例えば、上記CaCl₂溶液添加を加えると同時に、

（例えれば秒時計を始動させて）時間測定を開始し、混合試料を軽く混和した後37℃で反応させてフィブリン析出までの時間（凝固時間）を、分光光度計等を用いて測定すればよい。

【0028】本発明のLAC測定法においては、（従来法と異なって）リン脂質、Caイオン以外の血液凝固促進物質を加えることは必須でなく、またプロテインC系をも活性化させて生体内により近い状態（血液が簡単に固まらない状態）で凝固時間を測定するため、ある一定の時間内に「凝固する検体」がLAC陽性（異常）と判定され、該凝固時間内に「凝固しない検体」がLAC陰性（正常）と判断される。

【0029】凝固時間は、用いる検体の量および／又は用いる試薬の濃度（ないし使用量）によって変化するが、測定の迅速性および再現性のバランスの点からは、上記の異常値判定のための「一定時間」は100～300秒程度、更には300～1000秒程度であることが好ましい。

【0030】前述したように、従来のLAC測定方法においては、所定の時間（カットオフ値）内に凝固しない検体をLAC陽性と判定（すなわち、異常の有無を正常検体に対する凝固時間の「延長」で判定）していたのに対し、本発明のLAC測定方法においては、生体内における傾向に沿って、所定に時間内に「凝固する」検体をLAC陽性と判定（すなわち、異常の有無を正常検体に対する凝固時間の「短縮」で判定）することに特徴がある。

【0031】本発明においては、測定の再現性（測定精度）と迅速性とのバランスの点から、上記所定の時間（カットオフ値）は、1000秒以下が好ましい。このカットオフ値は、例えば、LAC陰性と考えられる健常者検体（好ましくは20検体以上）の測定値を統計的に処理し（例えば、確率紙法を用い、その分布の95%に対応する（健常者測定値の分布の平均）±2SD（標準偏差）の値を求める）、得られた凝固時間（カットオフ値）より短い凝固時間を示す検体をLAC陽性と判定することが好ましい。以下、実施例により本発明のLAC測定方法を更に具体的に説明する。

【0032】

【実施例】

実施例1（プロテインC活性化剤を用いる方法）

以下の測定においては、ベーリングガーマンハイム山之内（BMY）社製の自動凝固測定装置（商品名：コアスクリーナー）を用いて凝固時間の測定を行った。3.8%（又は3.18%）クエン酸ナトリウムを加えた被検血漿100μlを上記コアスクリーナー用の反応キュベット（内容積：約1ml、プラスチック製）に入れ、予め

37℃で約1分間加温した。この血漿に、それぞれ予め37℃で約1分間加温しておいたリン脂質（シグマ社製、兎脳ケファリン）の1%HSA（ヒト血清アルブミン）含有バルビタール緩衡溶液50μl（濃度0.25U/m1）、プロテインC活性化剤（ペンターファム社製プロタック、3IU/バイアルのものを使用）のHSA含有バルビタール緩衡液50μl（濃度3U/m1）、および2.5mM塩化カルシウム溶液100μlの3種の試薬を加えた。上記塩化カルシウム溶液の添加と同時に秒時計による時間の計測を開始し、上記混合試料を軽く混和して37℃で反応させた。凝固の有無の判定においては、上記コアスクリーナーによる吸光度変化によりフィブリンの析出（すなわち凝固）を判定した。

【0033】従来法（TTT法およびKCT法）による測定に基づき凝固因子およびプロテインC系がともに正常範囲と考えられる健常検体（血漿）10例について、上記した本実施例のLAC測定法により凝固時間を測定したところ、これらの健常者検体はCaCl₂添加から99.9秒経過しても凝固せず、本発明において、生体内と類似の反応系が実現されていることが判明した。一方、従来法によるトロンボプラスチック抑制試験（TTT法）でLAC陽性と判定された10検体について、上記した本実施例のLAC測定法で測定したところ、上記10検体のうち7検体がCaCl₂添加後9.9秒未満で凝固し、その凝固時間は33.9.9秒から86.6.7秒であった。

【0034】実施例2（活性化プロテインCを用いる方法）

クエン酸ナトリウム加血漿100μlをキュベットに入れ、予め37℃で約1分間加温した。この血漿に、それぞれ予め37℃で約1分間加温しておいたリン脂質（シグマ社製、兎脳リン脂質）の1%HSA含有バルビタール緩衡溶液50μl（濃度1.0U/m1）、活性化プロテインC（精製品）の1%HSA含有バルビタール緩衡液50μl（濃度1U/m1）、および2.5mM塩化カルシウム溶液100μlの3種の試薬を加えた。上記

塩化カルシウム溶液の添加と同時に秒時計による時間の計測を開始し、上記混合試料を軽く混和して37℃で反応させた。凝固の有無の判定においては、上記コアスクリーナーによる吸光度変化によりフィブリンの析出（すなわち凝固）を判定した。

【0035】従来法（TTT法およびKCT法）による測定に基づき凝固因子およびプロテインC系がともに正常範囲と考えられる健常検体（血漿）10例について、上記した本実施例のLAC測定法により凝固時間を測定したところ、これらの健常者検体は2.5mM塩化カルシウム添加から1000秒経過しても凝固しなかった。一方、従来法によるトロンボプラスチック抑制試験（TTT法）でLAC陽性と判定された10検体について、上記した本実施例のLAC測定法で測定したところ、上記10検体のうち7検体がCaCl₂添加後1000秒未満で凝固し、その凝固時間は22.7秒から97.6秒であった。

【0036】

【発明の効果】上述したように、本発明によれば（従来のLAC測定方法と異なり）リン脂質、Caイオン以外の凝固促進因子を必須とせず、「リン脂質、Caイオン以外の凝固促進物質」に代えてプロテインC系を活性化するプロテインC系活性化物質を組合せることにより、血管内に近い凝固促進／凝固抑制のバランスを試験管内（in vitro）で実現できる。したがって本発明によれば、生体内に極めて近い条件（すなわち、血液が容易には凝固しない条件）下で測定を行うLAC測定方法が提供される。

【0037】本発明のLAC測定方法によれば、生体内と著しく異なる条件（すなわち血液が極めて凝固しやすい条件）下で、しかも血栓症の傾向とは逆の「凝固時間の延長」でLAC陽性と判定していた従来のLAC測定方法とはまったく異なり、上述したように生体内に極めて近い条件で、しかも血栓症の傾向と同傾向の「凝固時間の短縮」でLAC陽性を判定することができる。